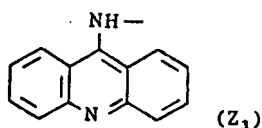
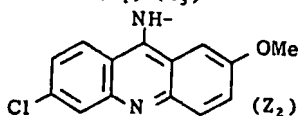
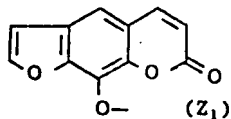


<p>86-030397/05 B04 CNRS 25.07.84  CNRS CENT NAT RECH SCI *EP -169-787-A  25.07.84-FR-011795 (29.01.86) A61k-31/70 C07h-21  Blocking nucleic acid sequences with modified oligo-nucleotide -  bonded to intercalation agent, e.g. to prevent replication or  development of viruses bacteria and parasites  C86-012603 E(AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE)</p>	<p>B(4-B3B, 4-B4A1)</p>
<p>The use of oligonucleotides (A) bonded to an intercalation agent for selectively blocking a nucleic acid sequence is new.  (A) consists of an oligonucleotide or oligodeoxynucleotide (opt. contg. modified nucleotides), complementary to the sequence to be blocked, to which is covalently bonded the intercalating gp.</p> <p><u>MORE SPECIFICALLY</u>  (A) are of formula:</p> $R - \left[ \begin{array}{c} B \\   \\ O - C - J \\   \\ O \end{array} - \begin{array}{c} X \\   \\ O - P - O \\    \\ O \end{array} \right]_n - \begin{array}{c} B \\   \\ O - C - J \\   \\ O \end{array} - OR'$ <p>B = same or different, opt. modified, nucleic acid base;</p>	<p>X = same or different, O<sup>-</sup>, S<sup>-</sup>, alkoxy or alkyl (opt. substd. by N-heterocyclyl), aryloxy, aminoalkyl, aminoalkoxy, thioalkyl or -Y-Z;  R and R' = H or -Y-Z;  Y = alkylene, <math>\begin{array}{c} O \\   \\ -P-O- \end{array}</math> (alkylene)- or -Y-O-Y;  Z = intercalating residue;  J = H or OH;  n = zero or integer.</p> <p><u>USE</u>  (A) are useful:  (1) for blocking replication/development of a virus, bacteria or parasite (esp. influenza or herpes virus); and  (2) for blocking expression of a gene coding for resistance to antibiotics, antivirals or antiparasitic agents. Alternatively, (A) are complementary for oncogenic genes.  (A) can be formulated with antibiotics, antiparasitic agents, antivirals or antitumour agents.</p> <p><u>PREFERRED</u></p>

EP-169787-A\*

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.  
128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England  
US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101  
Unauthorised copying of this abstract not permitted.

Intercalation residues are of formulae (Z<sub>1</sub>)-(Z<sub>3</sub>)



effects on uninfected cells. (59pp1251DAHDwgNo0/0).  
(F) ISR: EP-117777 4 Jnl. Ref.

#### EXAMPLE

The cpd. T-T-T-T-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-Z<sub>3</sub>(A') was prep'd. from a protected T<sub>4</sub> (see FR 8301223) by reaction with 9-(omega-hydroxypentylamino)acridine in the presence of mesitylene-sulphonyltetrazolide, then deprotection.

Monolayers of CV1 cells were infected with SV 40 virus, and 2 hr. later transferred to a nutrient medium contg. 80 µg/ml of (A'). After 3 days at 37°C, the cells were examined; the cytopathogenic effect was only 21% compared with 75% for controls not treated with (A'). This amt. of (A') had no toxic

EP-169787-A

© 1986 DERWENT PUBLICATIONS LTD.

128, Theobalds Road, London WC1X 8RP, England

US Office: Derwent Inc. Suite 500, 6845 Elm St. McLean, VA 22101

Unauthorised copying of this abstract not permitted.

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication:

0 169 787

A1

(12)

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 35401506.2

(51) Int. Cl.: C 07 H 21/00  
A 61 K 31/70

(22) Date de dépôt: 22.07.85

(30) Priorité: 25.07.84 FR 8411795

(42) Date de publication de la demande:  
29.01.86 Bulletin 86/5(64) Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE(71) Demandeur: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)  
15, Quai Anatole France  
F-75007 Paris(FR)(72) Inventeur: Helene, Claude  
252 Rue Haute  
F-45590 Saint Cyr en Val(FR)(72) Inventeur: Nguyen, Thanh Thuong  
31 Route de Tigy Vienne en Val  
F-45510 Tigy(FR)(74) Mandataire: Warcoin, Jacques et al,  
Cabinet Régimbeau 26, avenue Kléber  
F-75116 Paris(FR)

(54) Application d'oligonucléotides liés à un agent intercalant, notamment à titre de médicament.

(57) L'invention concerne l'application de composés oligonucléotides liés à un agent intercalant pour le blocage sélectif d'une séquence d'acide nucléique, dans laquelle ces composés sont constitués par un oligonucléotide ou un oligodésoxynucléotide constitué d'un enchaînement de nucléotides naturel ou modifié complémentaire de la séquence d'acide nucléique à bloquer sélectivement, sur lequel se trouve fixé par une liaison covalente un groupe d'intercalation.

Ces produits sont utiles notamment comme médicament.

EP 0 169 787 A1

APPLICATION D'OLIGONUCLEOTIDES LIES A UN AGENT  
INTERCALANT, NOTAMMENT A TITRE DE MEDICAMENT.

---

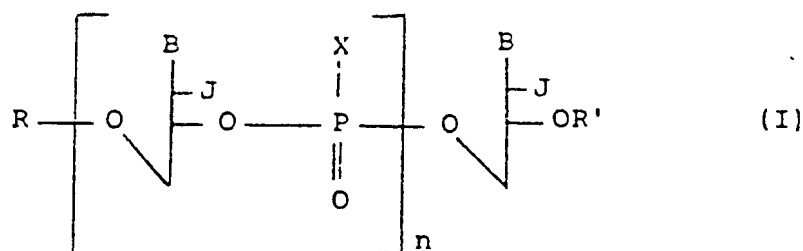
La présente invention concerne l'application d'oligonucléotides liés à un agent intercalant au blocage sélectif de l'expression d'un gène.

5 Plus particulièrement, la présente invention concerne l'application de composés oligonucléotides liés à un agent intercalant pour le blocage sélectif d'une séquence d'acide nucléique, dans laquelle ces composés sont constitués par un oligonucléotide ou un oligodésoxy-  
10 nucléotide constitué d'un enchaînement de nucléotides naturel ou modifié complémentaire de la séquence d'acide nucléique à bloquer sélectivement, sur lequel se trouve fixé par une liaison covalente un groupe d'intercalation.

15 Il convient de remarquer que dans le cadre de la présente demande, les termes "blocage sélectif" ont un sens très général mais s'appliquent, de préférence, à un "blocage in vivo". Ainsi, il peut s'agir du blocage d'une séquence impliquée dans l'initiation, la propagation ou la terminaison de la répllication d'un acide nucléique, de la transcription d'un ou plusieurs gènes et/ou de leur traduction.

Mais, il peut s'agir aussi d'une action de protection qui rend la séquence "bloquée" inaccessible pour une enzyme ou un composé chimique par exemple.

Parmi les composés utilisables dans la présente application, il faut citer plus particulièrement les composés de formule :



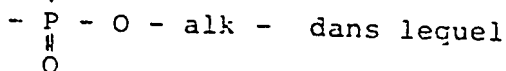
dans laquelle :

les radicaux B peuvent être identiques ou différents et représentent chacun une base d'un acide nucléique naturelle ou modifiée ;

les radicaux X, qui peuvent être identiques ou différents, représentent chacun un oxoanion  $O^{\ominus}$ , un thioanion  $S^{\ominus}$ , un groupe alkyle, un groupe alcoxy, aryloxy, alcoxy ou alkyle substitué par un hétérocycle azoté, un groupe aminoalkyle, un groupe aminoalcoxy, un groupe thioalkyle ou un groupement -Y-Z ;

R et R', qui peuvent être identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement -Y-Z dans lequel :

Y représente un radical alcoylène droit ou ramifié -alk- ou un radical E



E peut avoir les mêmes significations que X ; ou bien un radical  $-Y''-O-Y'$  où  $Y''$  et  $Y'$  peuvent avoir les significations données pour Y ; et

5 Z est un radical correspondant à un agent d'intercalation ;

J représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxy ;

n est un nombre entier y compris 0.

10 Il convient de remarquer que la formule I représente un enchaînement de nucléotides qui peuvent être identiques ou différents, n indiquant simplement le nombre de nucléotides compris dans la molécule ; n est de préférence un nombre compris entre 1 et 50 et de préférence entre 1 et 25.

15 Les agents d'intercalation Z sont des composés connus dans les techniques touchant aux acides nucléiques, il s'agit de composés capables de "s'insérer" dans la structure des ADN ou des ARN.

20 Ces agents d'intercalation sont, en général, constitués par des composés polycycliques ayant une configuration plane tels que l'acridine, la furocoumarine, la daunomycine, la 1,10-phénanthroline, la phénanthridinium, les porphyrines, l'ellipticine ou l'ellipticinum et leurs dérivés.

25 Parmi les significations de Z, trois seront utilisées plus particulièrement :

- le groupe oxy-8-psoralène ( $Z'$ ),
- le groupe méthoxy-2-chloro-6-amino-9-acridine ( $Z''$ ), et
- le groupe amino-9-acridine ( $Z'''$ )

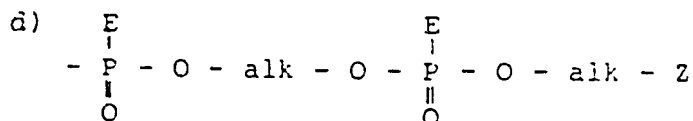
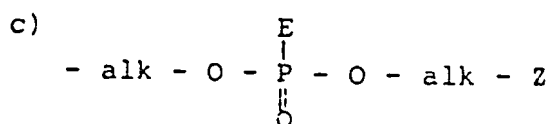
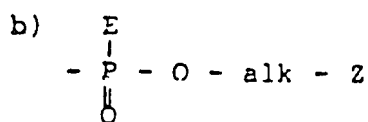
30 Le radical B est, de préférence, constitué par une base naturelle d'un acide nucléique, par exemple la thymine, l'adénine, la cytosine, la guanine ou l'uracile ; mais, il est également possible d'utiliser des bases d'acides nucléiques modifiées, comme la 2-amino-adénine

et ses dérivés substitués, par exemple sur le N<sup>6</sup> par un groupe aminoalkylène ou par un groupe azidophénylalkylène ; ou la guanine substituée sur le O<sup>6</sup>, par exemple par un groupe ( $\omega$ -alkylène)-9-acridine ; ou la 8-( $\omega$ -aminoalkyl)-aminoadénine et ses dérivés substitués sur le NH<sub>2</sub> en  $\omega$  par un groupe acridine ; ou des dérivés halogénés ou azidés, par exemple la 5-bromo-uracile ou la 8-azidoadénine. En outre, il est possible d'utiliser des dérivés photo-activables des bases.

Le radical X, bien qu'il représente de préférence un oxoanion, peut avoir d'autres significations ; lorsque le radical X représente un groupement alkyle, il s'agit de préférence d'un groupement alkyle inférieur en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub> et, par exemple, les groupements éthyle, méthyle ou propyle ; lorsque le radical X représente un groupe alcoxy, il s'agit de préférence d'un groupement alcoxy inférieur en C<sub>1</sub> à C<sub>7</sub>, par exemple le groupement méthoxy ou éthoxy ; lorsque X représente un groupement amino-alkyle ou amino-alcoxy, il peut s'agir d'un groupement amino-alkyle mono-substitué, disubstitué ou bien d'un radical amino sous forme de sel d'ammonium quaternaire, dans ces conditions, les substituants sont, de préférence, des radicaux alkyles inférieurs comme définis précédemment ; quant à la chaîne alkyle ou alcoxy reliant le radical amino au phosphore, il s'agit de préférence d'une chaîne droite ou ramifiée comportant de 1 à 10 atomes de carbone ; lorsque le radical alkyle ou alcoxy est substitué par un hétérocycle azoté, il s'agit notamment de cycle saturé à 5-6 chaînons comportant un atome d'azote qui peut être quaternaire ; enfin, lorsque le radical X est un radical thioalkyle, il s'agit de préférence d'un radical thioalkyle inférieur, c'est-à-dire qui comporte entre 1 et 7 atomes de carbone.

R et R', outre la signification hydrogène, peuvent représenter notamment :

a) - alk - 2



Le radical -alk- est de préférence un radical alcoylène droit ou ramifié ayant de 1 à 10 atomes de carbone.

La présente invention concerne également l'application des composés précédents sous forme de sel avec des bases ou des acides, et les composés sous forme racémique, ou sous forme d'isomères R ou S optiques purifiés ou en mélange.

L'objet de la présente invention est, en particulier, l'application de ces composés pour réaliser :

1°) Le blocage spécifique des gènes cellulaires préalablement choisis,

2°) Le blocage sélectif de la réplication et/ou du développement de virus, bactéries ou parasites.

Ce blocage est obtenu par la formation de complexes d'interaction spécifique entre les composés de formule I et les séquences nucléiques complémentaires.

Selon la présente invention, on peut contrôler l'expression d'un gène en utilisant un composé de formule I dont la séquence est complémentaire de celle d'une région spécifique du gène ou de l'ARN messenger correspondant.



La réplication d'un ADN ou d'un ARN peut être bloquée par un composé de formule I dont la séquence est complémentaire d'une région de régulation, d'initiation ou de propagation de la réplication.

5 Si le produit de l'expression du gène visé est vital pour le virus ou pour la bactérie ou pour le parasite, ou si la réplication de l'ADN ou de l'ARN est bloquée, alors les composés de formule A agiront comme substances antivirales ou comme antibiotiques ou  
10 comme produits antiparasitaires.

Si le produit de l'expression du gène visé n'est pas vital pour l'organisme, on peut alors moduler ou supprimer sélectivement ses effets. Dans ce cas, les composés de formule I agiront par exemple soit comme  
15 substances antitumorales, lorsque le gène visé est un gène oncogène ou un gène impliqué dans l'immortalisation ou la transformation cellulaire, soit comme une substance qui permet de supprimer le caractère de résistance aux antibiotiques, aux antiviraux et aux antiparasitaires  
20 lorsque le gène visé est le ou les gènes de résistance correspondants.

Ainsi, on peut, par exemple, bloquer la synthèse de la protéine 32 du bactériophage T4 en utilisant les composés suivants (voir l'exemple XVII) :  
25 T-T-T-A-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Z"  
T-T-T-A-A-T-T-T-A-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Z"  
T-T-T-A-A-T-T-T-A-A-T-T-T-A-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Z"  
dont les séquences sont complémentaires de la région  
située en amont du codon d'initiation sur l'ARN messager  
30 (voir tableau III).

De même, l'exemple XVIII montre qu'on peut réprimer le gène de la  $\beta$ -lactamase qui est responsable de la résistance des bactéries aux antibiotiques comportant le cycle  $\beta$ -lactame en utilisant les séquences suivantes :

5' C-C-C-T-G-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Z"

5' T-A-A-C-C-C-T-G-A-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Z"

qui sont complémentaires de la région d'initiation de la transcription de ce gène.

Selon la présente invention, on peut inhiber le développement d'un virus oncogène ou non oncogène en employant un composé de formule I dont la séquence est complémentaire d'une région spécifique d'ADN ou d'ARN viral.

L'heptanucléotide 5' A-A-A-G-C-A-G-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Z" dont la séquence est complémentaire de celle des extrémités 3' terminales des 8 ARN du virus de la grippe de type A (Desselberger U., Racaniello V.R., Zagra J.J. et Palese P. (1980) Gene 8, 315-328) inhibe totalement l'effet cytopathogène de ce virus (voir exemple XIX).

Parmi les trois virus suivants : virus SV 40, virus de la grippe A/WSN et virus de l'herpès, qui ont été soumis à l'action des composés :

5' T-T-T-T-T-T-T-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> Z",

5' T-T-T-T-T-T-T-Et, et

HO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> Z",

seul le virus SV 40 qui possède la séquence :

5' T-T-T-T-T-T-T-T

. . . . .

3' A-A-A-A-A-A-A-A

au voisinage de l'origine de répllication et de transcription des gènes précoces (Soeda E. et Miura K.I. (1979) FEBS Letters 101, 359-362) est sensible au composé (T-)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> A

ip<sup>®</sup>  
L'octathymidate (T-) <sub>8</sub> est dépourvu du groupe intercalant  
Z" est inactif vis-à-vis de ces virus ; tandis que  
l'effet cytotoxique du composé HO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> Z" est trop  
important pour que son activité antivirale puisse être  
mise en évidence (voir exemple XX).

Les composés de la présente invention possèdent  
donc à la fois une grande sélectivité et une forte affinité  
pour les séquences nucléiques cibles. Cette forte affinité  
spécifique se traduit ainsi par la très faible toxicité  
des composés de l'invention vis-à-vis des cellules saines  
(voir exemples XIX et XX).

Ces résultats montrent que les composés de la  
présente invention peuvent être utilisés soit pour réguler  
l'expression d'un gène, soit pour bloquer le développe-  
ment d'un virus, d'une bactérie ou d'un parasite. Les  
composés de formule I, par leur grande affinité spécifique  
pour les séquences nucléiques complémentaires, sont à la  
fois supérieurs aux oligonucléotides seuls qui possèdent  
une affinité plus faible pour les séquences complémentaires  
et à l'agent intercalant seul qui est toxique vis-à-vis  
des cellules saines par manque de spécificité.

Les composés selon la présente invention sont  
donc applicables à titre de médicament dans le traitement  
des maladies d'origine virale, bactérienne ou parasitaire,  
et également à titre d'agent antitumoral. Ils peuvent  
également être utilisés pour rendre sensibles à différents  
antibiotiques, antiviraux ou antiparasitaires, des souches  
jusque là résistantes en bloquant les gènes responsables  
de cette résistance.

Les dosages et les voies d'administration de  
ces composés pourront varier suivant la nature de l'affection  
traitée et du type d'activité à attendre pour le composé.

La présente invention concerne également des  
compositions pharmaceutiques comportant à titre de principe  
actif au moins un médicament tel que décrit précédemment,

seul ou en association avec un antibiotique, un anti-parasitaire, un antiviral ou un agent antitumoral, ainsi qu'un support acceptable dans le domaine pharmaceutique.

Selon la présente invention, on peut améliorer l'efficacité des composés de formule I par des modifications diverses, par exemple au niveau des groupes phosphoesters, au niveau du bras reliant l'oligonucléotide à l'intercalant, au niveau des bases nucléiques. Par ces modifications, on peut par exemple augmenter l'affinité de ces substances pour les séquences d'acides nucléiques complémentaires, rendre ces composés stables vis-à-vis des nucléases et faciliter leur passage à travers les membranes cellulaires.

On peut augmenter l'affinité des composés de l'invention pour les séquences nucléiques complémentaires en remplaçant le groupe adénine par le groupe amino-2-adénine qui permet de créer une liaison hydrogène supplémentaire avec le O-2 de la thymine ou de l'uracile des acides nucléiques.

On peut aussi augmenter l'affinité des composés de l'invention pour les séquences nucléiques complémentaires en remplaçant partiellement ou totalement les groupes phosphodiester soit par des groupes phosphotriesters ou phosphonates neutres, soit par des groupes porteurs de charges positives. Dans le premier cas, cette modification permet de réduire ou de supprimer les répulsions électrostatiques entre les charges négatives des groupes phosphodiester d'oligonucléotides et les charges négatives de la séquence complémentaire d'acide nucléique. Dans le second cas, les modifications augmentent l'affinité vis-à-vis des séquences complémentaires par attraction électrostatique.

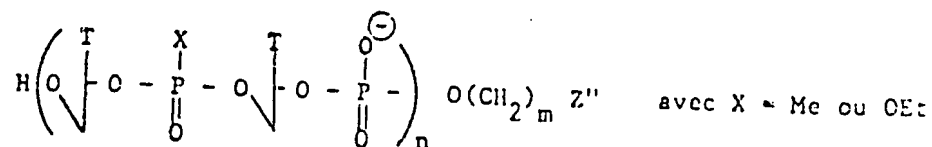
La substitution de  $n$  groupes phosphodiester par  $n$  groupes phosphotriesters ou phosphonates conduit à la formation de  $n^2$  stéréoisomères dont les propriétés physicochimiques et biochimiques peuvent être très diffé-

Le tableau suivant compare les températures de demi-dissociation des complexes formés entre le poly(rA) et les oligothymidylates I dont le groupe phosphodiester est remplacé ou non par un groupe méthylphosphonate. Ces résultats montrent que la substitution des groupes phosphodiester des composés I permet d'augmenter leur affinité pour la séquence nucléique complémentaire.

	<u>Configuration du groupe méthylphosphonate</u>	<u>T<sub>1/2</sub> (°C)</u>
5	$\text{H} \left( \text{O} \begin{array}{c} \text{T} \\ \diagup \end{array} \text{O} - \text{P}^* \begin{array}{c} \text{Me} \\   \\ \text{O}^- \end{array} - \text{O} \begin{array}{c} \text{T} \\ \diagup \end{array} \text{O} - \text{P} \begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{O} \end{array} \right)_2 \text{O}(\text{CH}_2)_5\text{Z}''$	41 9 28
10	$\text{H} \left( \text{O} \begin{array}{c} \text{T} \\ \diagup \end{array} \text{O} - \text{P} \begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{O} \end{array} \right)_4 \text{O}(\text{CH}_2)_5\text{Z}''$	31
	$\text{H} \left( \text{O} \begin{array}{c} \text{T} \\ \diagup \end{array} \text{O} - \text{P} \begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{O} \end{array} \right)_4 \text{OC}_2\text{H}_5$	~ 0

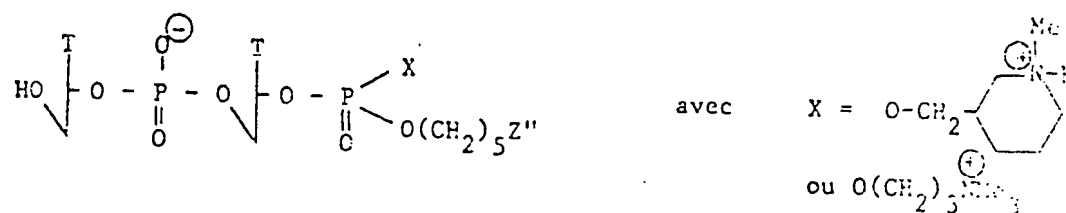
Les valeurs de T<sub>1/2</sub> ont été déterminées pour un rapport 1:1 (T:A) à la concentration de 5 x 10<sup>-5</sup> M en intercalant et dans un tampon à pH 7 contenant 10<sup>-2</sup> M cacodylate de sodium et 0,1 M NaCl.

Selon la présente invention, la substitution des groupes phosphodiester par des groupes phosphotriesters ou phosphonates neutres, ou mieux, chargés positivement, apporte à la chaîne nucléotidique une plus grande stabilité vis-à-vis des nucléases. Par exemple, les composés répondant à la structure suivante :



ne sont pas dégradés par les exonucléases telles que l'exonucléase extraite de la rate de veau et du venin de serpent (l'inactivité de cette dernière est due au blocage de l'hydroxyle-3').

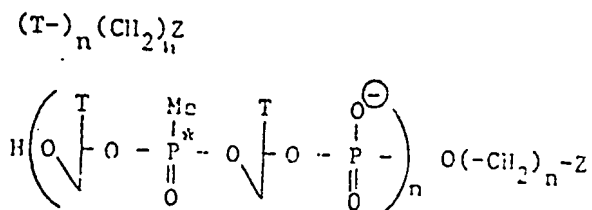
Les composés suivants :

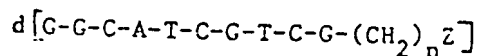
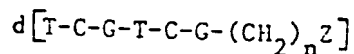
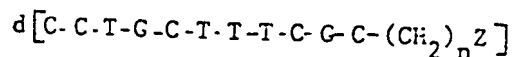
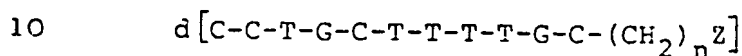
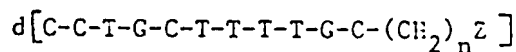
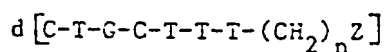
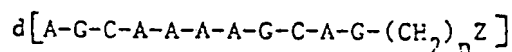
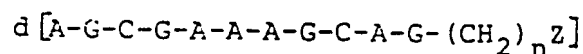
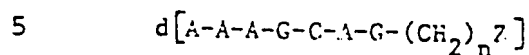
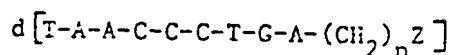
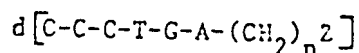
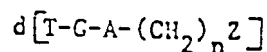
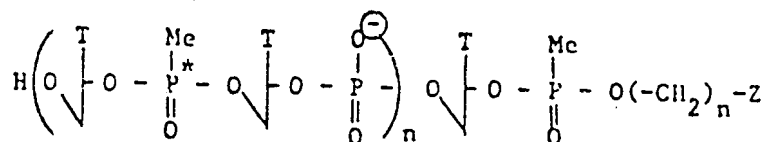


sont à la fois stables vis-à-vis de ces exonucléases et de l'endonucléase  $\text{P}_1$  extraite de *Penicillium citrium* dans les conditions où le dinucléoside TpT est totalement dégradé par ces enzymes.

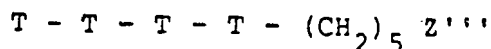
La synthèse des nouveaux composés de la présente invention peut être réalisée selon des procédés analogues à ceux déjà décrits dans le brevet français n° 83 01223 du 27 janvier 1983.

Parmi ces composés, on peut citer, par exemple, les composés de formule :





15 Les exemples suivants sont destinés à illustrer d'autres caractéristiques et avantages de l'invention, mais ne la limitent évidemment nullement.

EXEMPLE I

1) (DMTr)  $T - T - T - T - (CH_2)_5 Z'''$

On fait réagir pendant 1 heure à la température ambiante un mélange de 1 équivalent de (DMTr)  $T - T - T - T -$  Ar (préparé selon le brevet français n° 83 01223), 1,5 équivalent de ( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9 acridine et 2 équivalents de mésithylène-sulfonyltétrazolide (MST) dans la pyridine anhydre. Après avoir détruit l'excès du réactif de couplage par addition de l'eau glacée, le produit est extrait avec du chloroforme puis purifié sur gel de silice en utilisant les mélanges  $CH_2Cl_2$ , MeOH (99:1 à 90:10, v/v).

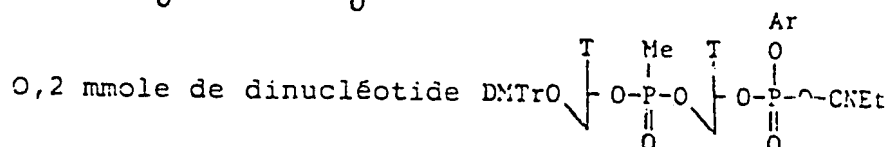
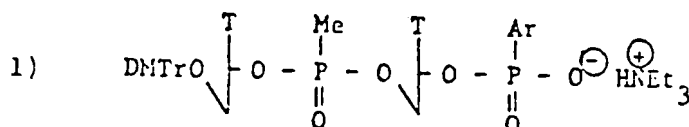
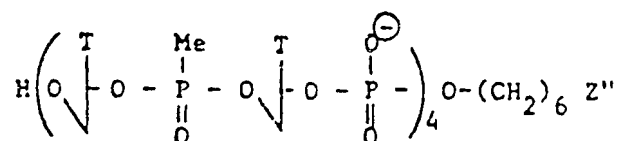
2) On fait réagir sous agitation pendant une nuit et à la température ambiante le tétranucléotide préparé précédemment avec une solution molaire en acide benzo-hydroxamique et en 1,8-diazabicyclo (5,4,0) undec-7-ène (DBU) dans la pyridine anhydre et en utilisant 10 équivalents d'acide benzohydroxamique-DBU par équivalent de phosphoester arylé à déprotéger. On neutralise le milieu réactionnel avec du DOWEX 50 (forme pyridinium), on filtre et lave la résine avec un mélange eau, MeOH (1:1, v/v), puis on chasse le solvant sous vide. Le résidu obtenu est traité avec de l'acide acétique à 80 % pendant 1 à 2 heures à la température ambiante. On élimine l'acide acétique sous vide par coévaporation plusieurs fois avec de l'éthanol ; on reprend le résidu avec de l'eau puis on lave la phase aqueuse avec de l'éther. Le produit est purifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) d'abord par échange d'ion puis en phase inverse. Les temps de rétention du produit purifié sont donnés dans les tableaux I et II.



EXEMPLE II

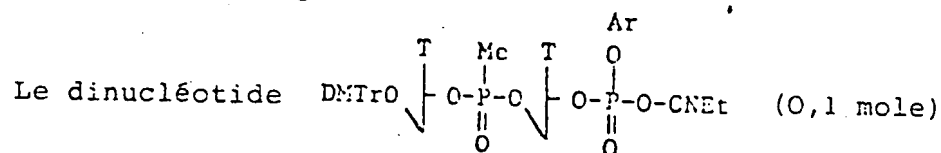
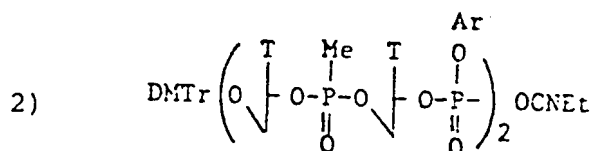
Octathymidilate dérivé d'acide méthylphosphonique dont la configuration est sous forme de mélange de stéréoisomères.

5



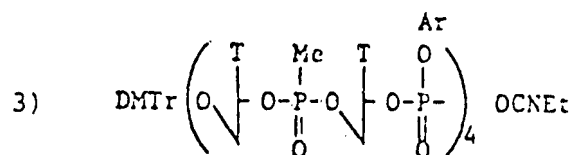
(préparé selon le brevet français n° 83 01223) est traité pendant 2 heures à la température ambiante avec 4 ml d'une solution de pyridine-triéthylamine (2:1, v/v). On chasse le solvant sous vide puis on lave le solide obtenu avec de l'éther.

10

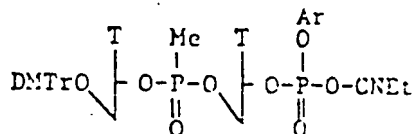


est traité avec 1,5 ml d'acide benzène sulfonique (2 % en solution dans le chloroforme, méthanol, 7:3, v/v) à 0°C pendant 15 minutes. Le mélange est repris avec 20 ml de chloroforme et lavé avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> à 5 % puis séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentré sous vide. A ce

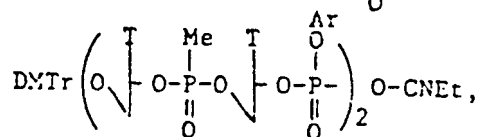
résidu on ajoute 0,12 mmole de diester préparé d'après II-1. Après avoir séché le mélange par coévaporation avec la pyridine, on ajoute au résidu 1,5 ml de pyridine anhydre et 0,3 mmole de MST et on laisse le mélange réactionnel à la température ambiante pendant 2 heures sous agitation puis on termine la préparation comme dans l'exemple I-1. Rendement = 65 %.



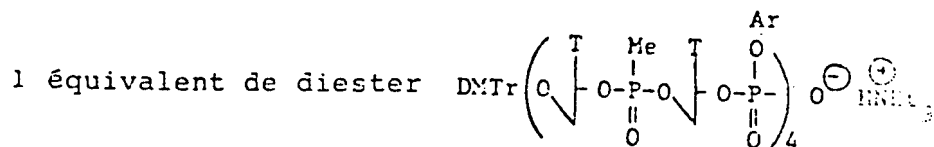
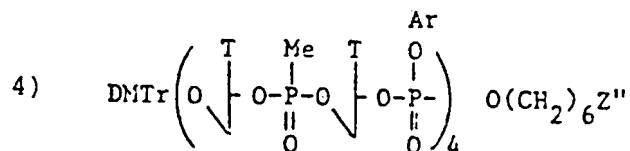
On opère comme dans l'exemple II-1 et l'exemple II-2 en remplaçant le composé



par le composé



on obtient l'octathymidylate qui est purifié sur silice en présence du système de solvants :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , eau, acétone (43:2:55, v/v).

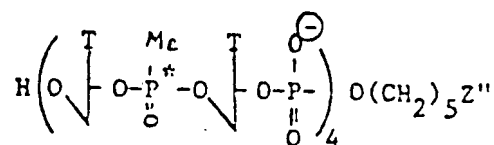


- (préparé par action de la triéthylamine sur le triester II-3 selon l'exemple II-1) est couplé avec la méthoxy-2-chloro-6( $\omega$ -hydroxyhexylamino)-9 acridine (2 équivalents) en présence de MST (3 équivalents) dans la pyridine anhydre. Après avoir détruit l'excès du réactif de couplage par addition d'eau glacée, le produit est extrait avec du chloroforme puis purifié sur gel de silice en présence du système de solvants :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , eau, acétone (20:5:75, v/v).
- 5
- 10 5) La déprotection du composé II-4 est réalisée comme dans l'exemple I-2 sauf pour la désarylation qui nécessite environ 24 heures ; le produit est ensuite purifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les tableaux I et II donnent les temps de rétention
- 15 du produit purifié.

#### EXEMPLES III et IV

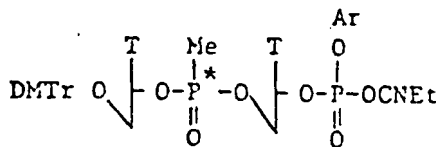
Octathymidylates dérivés d'acide méthylphosphonique dont la configuration est sous forme d'isomère S (III) et d'isomère R (IV)

20



En partant de chacun des isomères S (oua) et

R (oub) du dinucléotide

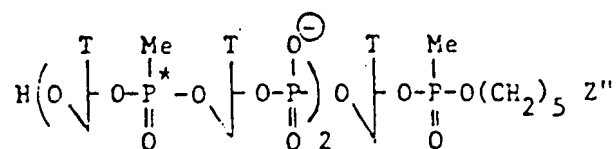


(préparés selon le brevet français n° 83 01223) et en opérant selon l'exemple II en remplaçant la méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxyhexylamino)-9 acridine par la méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9 acridine, on a préparé

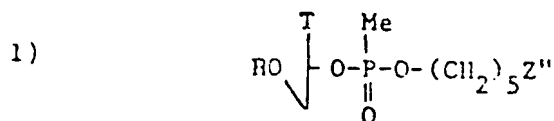
5 les octathymidylates dont les groupes méthylphosphonates possèdent soit la configuration S (III) soit la configuration R (IV).

Les temps de rétention des produits purifiés sont réunis dans les tableaux I et II.

#### 10 EXEMPLE V



Les groupes méthylphosphonates internucléotidiques possèdent la configuration S.



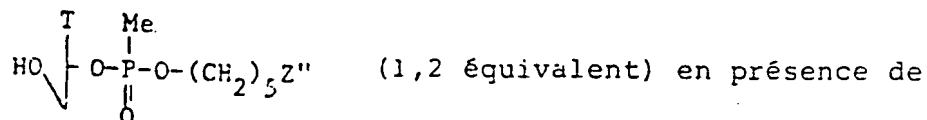
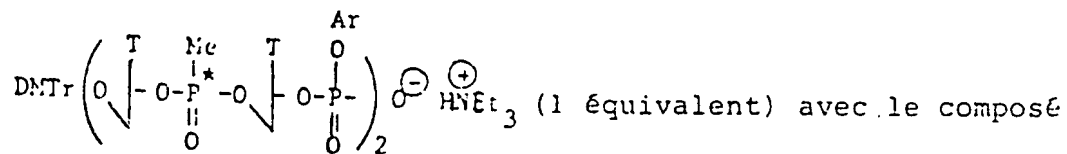
15 Le 5'-O(diméthoxytrityl)thymidine-3' méthylphosphonate (préparé selon le brevet français n° 83 01223) (1 équivalent) est traité pendant 2 heures sous agitation à la température ambiante avec la méthoxy-2 chloro-6 ( $\omega$ -hydroxypentylamino)-9 acridine (2 équivalents) en

20 présence de MST (3 équivalents). On détruit l'excès de MST par addition d'eau glacée, extrait le produit formé avec du chloroforme puis on purifie par chromatographie sur gel de silice. Le produit est ensuite détritylé par un traitement avec l'acide benzène sulfonique (2 % en

25 solution dans le chloroforme, méthanol (7:3, v/v) à 0°C

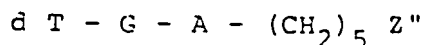
pendant 15 minutes. Le mélange est repris avec du chloroforme et lavé avec une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  à 5 % puis séché sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et concentré sous vide. Le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice.

- 5      2)      En couplant l'isomère S du tétranucléotide



MST (3 équivalents) et en opérant comme dans l'exemple I, on a obtenu le pentathymidylate dont le temps de rétention en HPLC est donné par le tableau II.

#### EXEMPLE VI



- 1)      d bz A<sup>-</sup> +  $(\text{CH}_2)_5 \text{Z}''$

Le composé  $(\text{DMTr})\text{dbzA}^-(\text{CH}_2)_5\text{Z}''$  (1 mmole) (brevet français n° 83 01223) est traité pendant 15 minutes à 0°C avec 10 ml d'une solution d'acide benzène sulfonique à 2 % dans le chloroforme, méthanol (7:3, v/v). La solution est reprise avec du chloroforme et lavée avec une solution aqueuse de  $\text{NaHCO}_3$  à 5 % puis séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et concentrée sous vide.

## 2) (DMTr) dT + ib G - Ar

Le dinucléotide (DMTr)dT<sup>-</sup>ibG<sup>-</sup>CNEt (1,2 mmole) (préparé selon le brevet français n° 83 01223) est traité pendant 2 heures à la température ambiante avec 3 ml d'une solution de pyridine-triéthylamine (2:1, v/v). On chasse le solvant sous vide puis on lave le solide obtenu avec de l'éther.

3) (DMTr) dT + ib G + bz A + (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> Z"

Les composés dbzA<sup>+</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Z" et (DMTr)dT<sup>-</sup>ibG-Ar sont mélangés puis séchés par coévaporation plusieurs fois avec la pyridine anhydre. A ce résidu on ajoute 10 ml de pyridine et 3 mmoles de MST puis on laisse 1 à 2 heures sous agitation à la température ambiante. On détruit l'excès du réactif de couplage par addition de l'eau glacée, on extrait le produit avec du chloroforme puis on sèche la solution chloroformique sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après avoir chassé le solvant sous vide, le produit est purifié sur gel de silice en utilisant successivement les systèmes de solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, acétone (46:2:52 et 40:2:58, v/v).

4) Le trinucéotide VI-3 (1 équivalent) est traité pendant une nuit à la température ambiante avec une solution molaire de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-C(=O)-NHOH-DBU dans la pyridine (on

utilise 10 équivalents de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-C(=O)-NHOH-DBU par équivalent

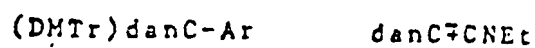
de groupe arylphosphoester à déprotéger). A cette solution on ajoute ensuite 2 volumes de solution de soude molaire dans MeOH, H<sub>2</sub>O (2:1, v/v) puis on continue l'agitation pendant 2 jours à la température ambiante. Après avoir neutralisé le mélange réactionnel avec une résine anionique

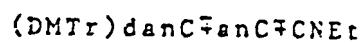
(forme pyridinium), on chasse le solvant sous vide, puis on traite le résidu obtenu pendant 1 à 2 heures à la température ambiante avec de l'acide acétique à 80 %. On termine la préparation comme dans l'exemple I.

5                    Le temps de rétention du produit purifié est donné dans le tableau II.

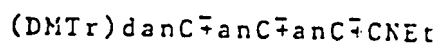
#### EXEMPLES VII à XVI

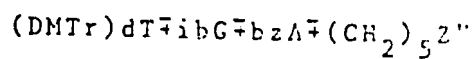
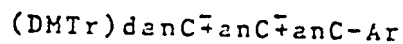
10                    En utilisant des oligonucléotides intermédiaires préparés selon les procédés décrits dans le brevet français n° 83 01223 et en opérant comme dans l'exemple VI pour les étapes de détritulation, de décyanoéthylation et de couplage, on prépare les oligonucléotides protégés selon les schémas donnés ci-après ; on élimine ensuite les groupements protecteurs comme dans l'exemple VI en  
15                    augmentant la durée de déprotection pour des séquences plus longues (2 jours pour la désarylation avec le couple acide benzohydroxamique-DBU). Les oligonucléotides déprotégés VII à XVI sont ensuite purifiés par échange d'ion puis en phase inverse sur C<sub>18</sub>. Les tableaux I et II donnent  
20                    les temps de rétention des composés préparés.

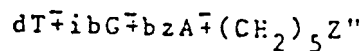
EXAMPLE VII

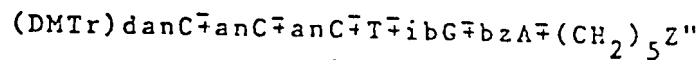
$$\downarrow \text{MST}$$


$$\downarrow \text{H}^{\oplus}$$


$$\downarrow \text{MST}$$


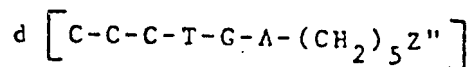
$$\downarrow \text{NET}_3$$


$$\downarrow \text{H}^{\oplus}$$


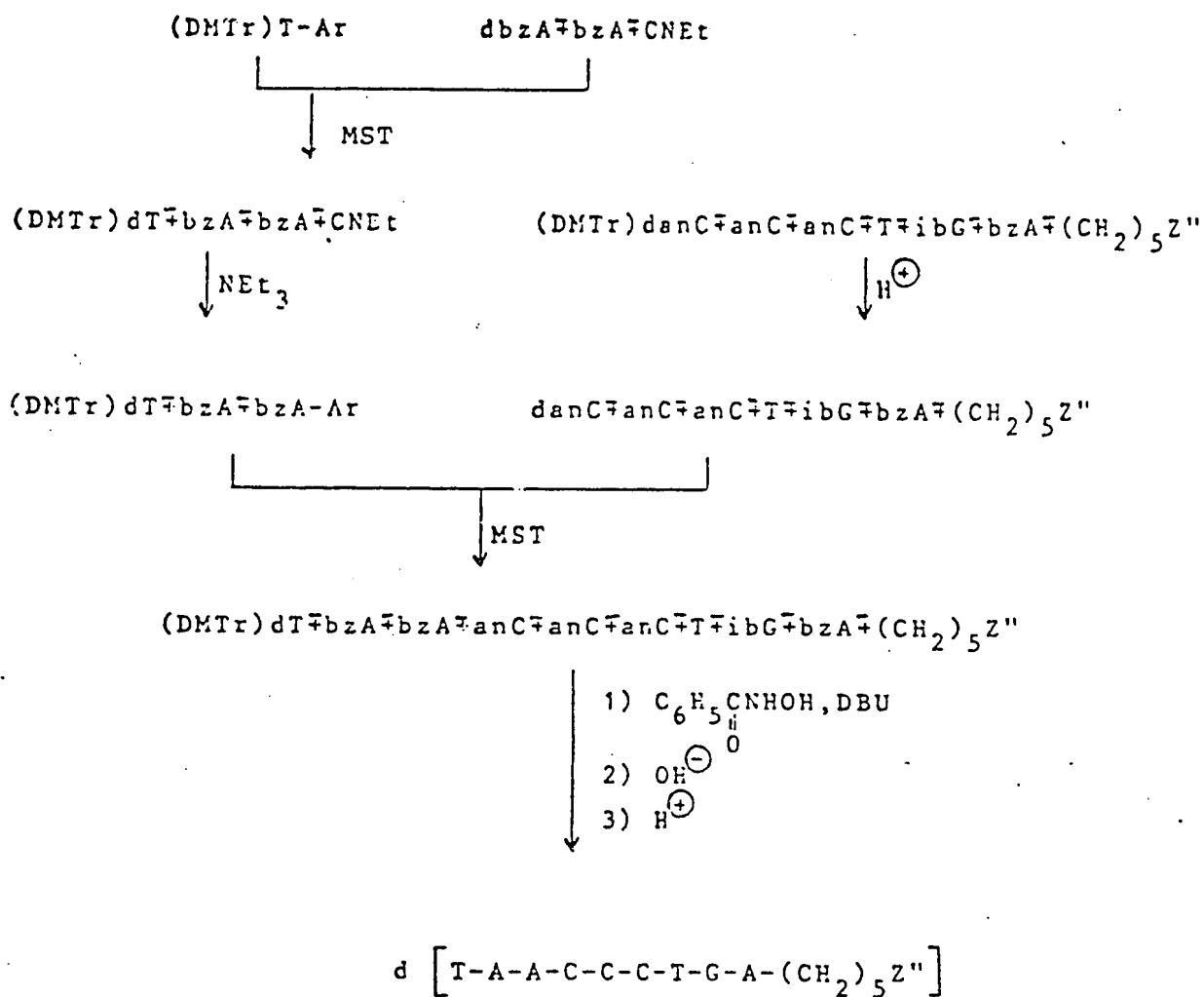
$$\downarrow \text{MST}$$


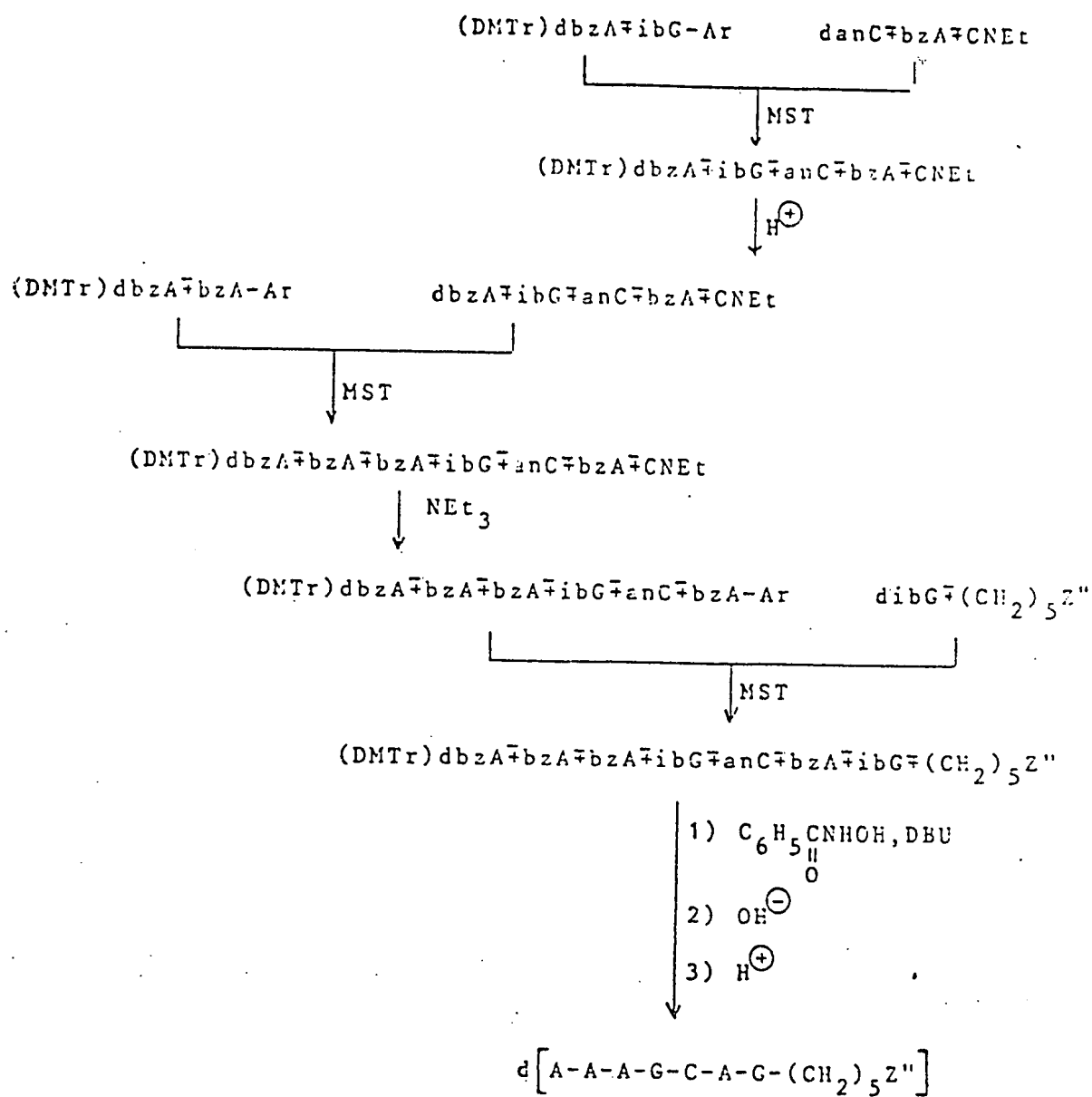
$$1) \text{C}_6\text{H}_5\text{CNHOH, DBU}$$

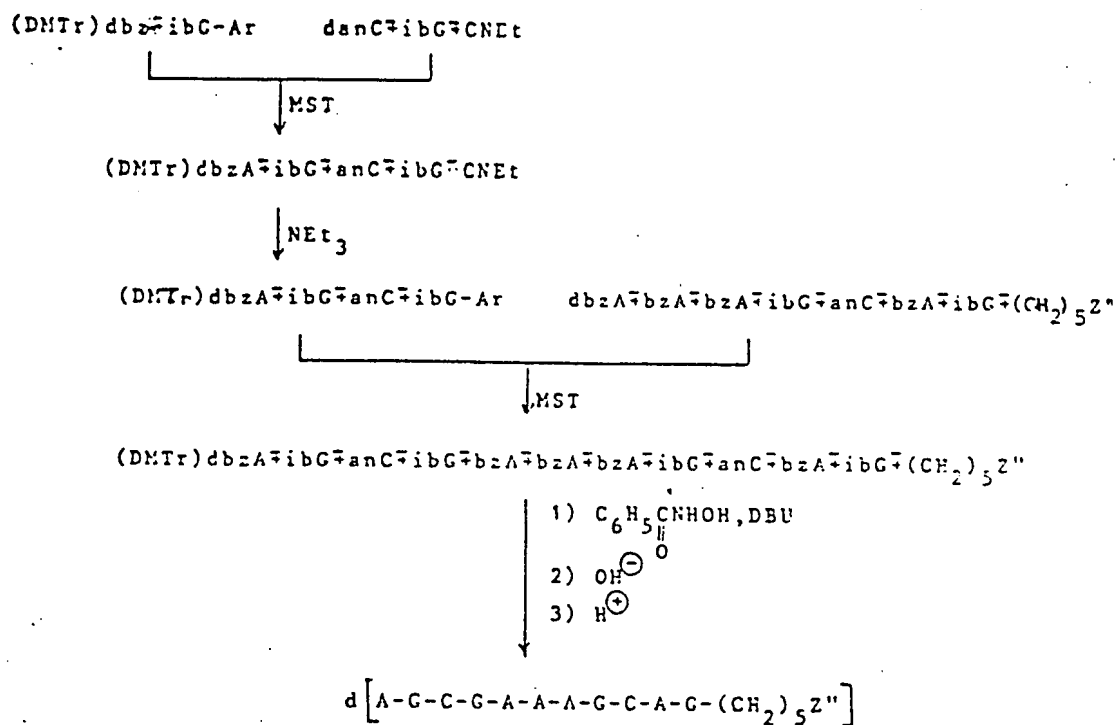
$$2) \text{OH}^{\ominus}$$

$$3) \text{H}^{\oplus}$$




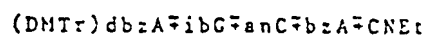
EXAMPLE VIII

EXAMPLE JX

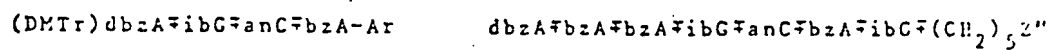
EXAMPLE X

EXAMPLE XI

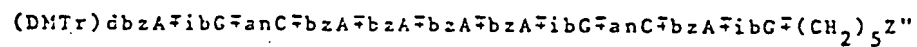
↓ MST



↓ NEt<sub>3</sub>



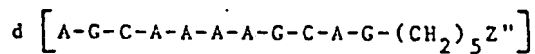
↓ MST

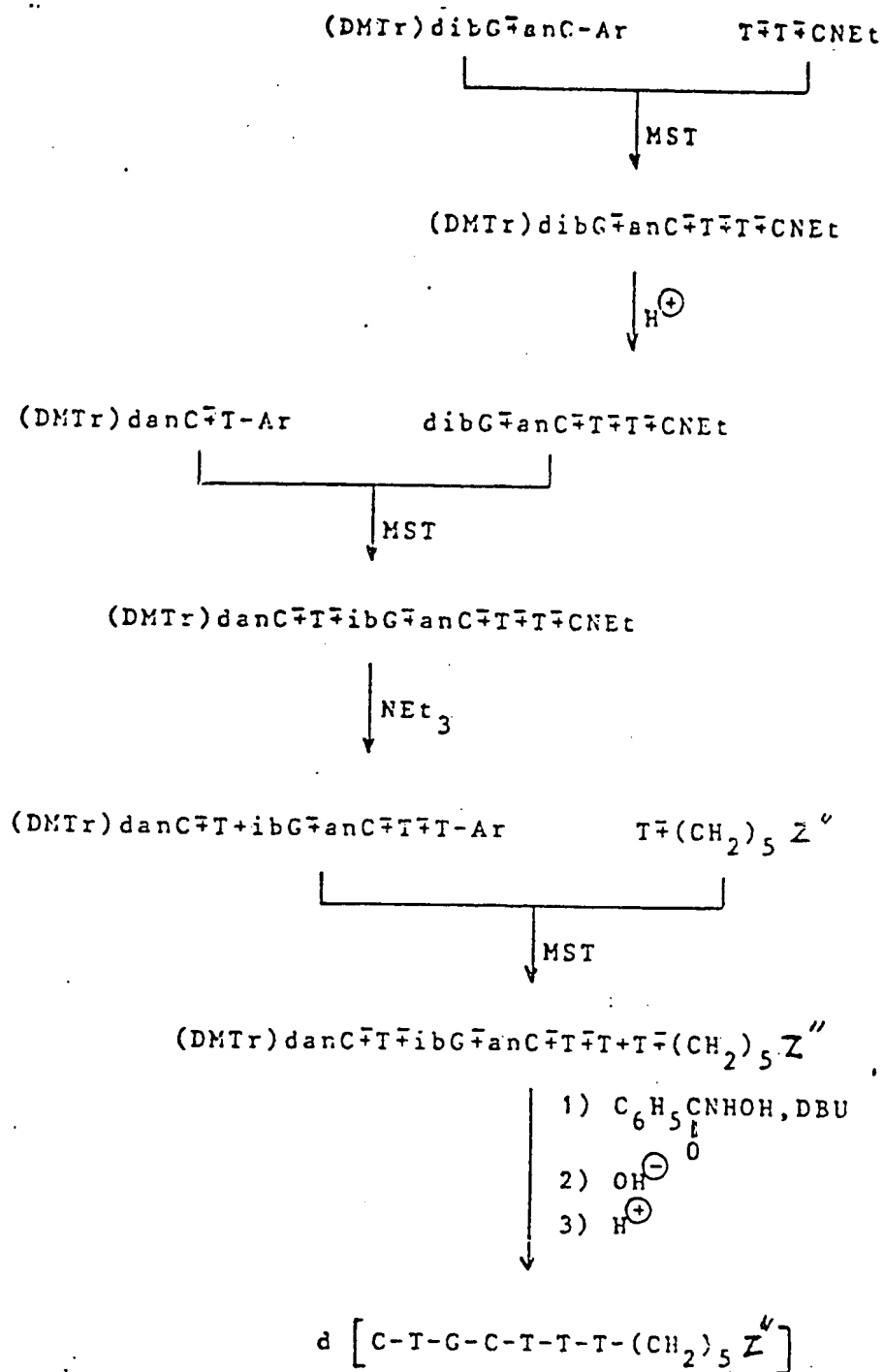


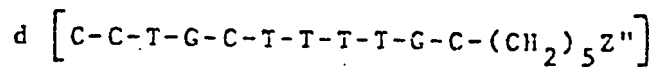
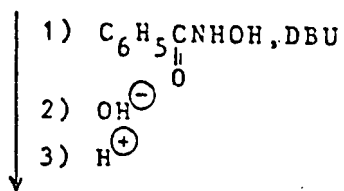
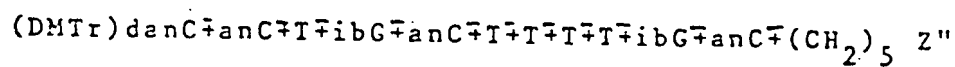
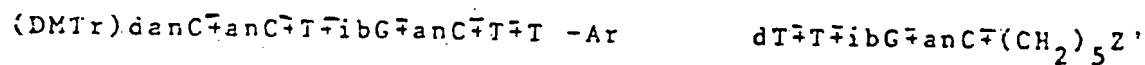
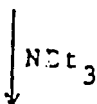
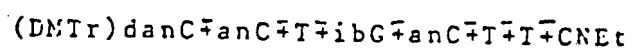
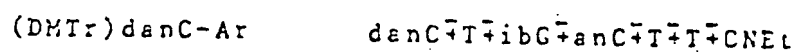
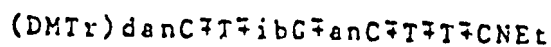
1) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CNHOH, DBU

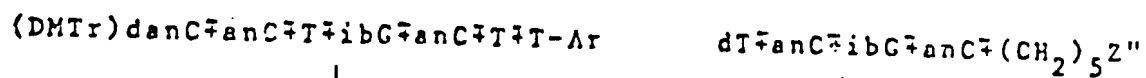
2) OH<sup>-</sup>

3) H<sup>+</sup>

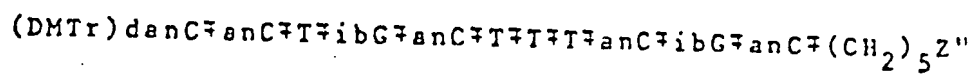


EXAMPLE XII

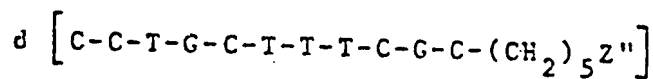
EXAMPLE XIII

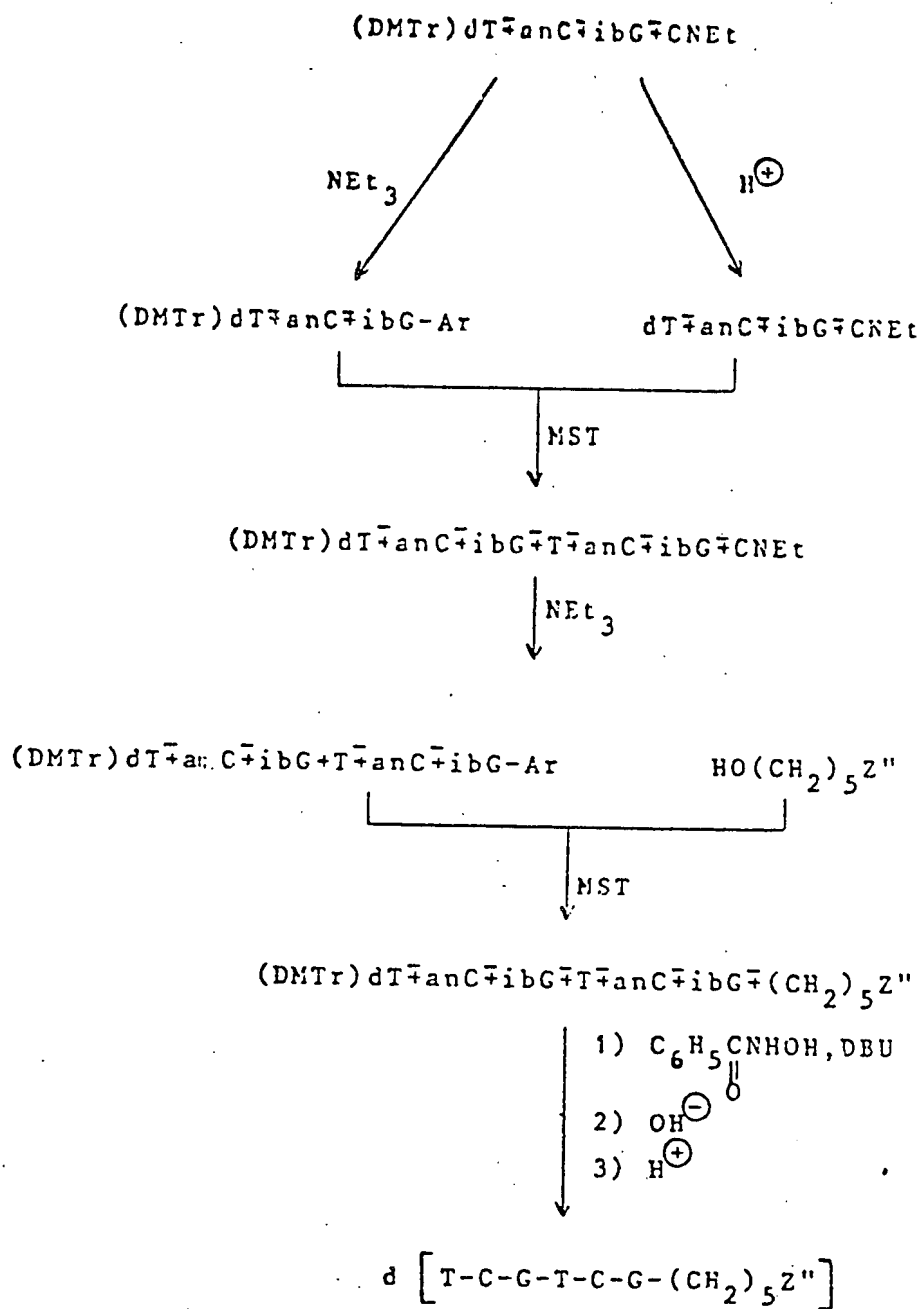
EXEMPLE XIV

↓  
MST



- 1)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CNHOH}, \text{DBU}$
- 2)  $\text{OH}^-$
- 3)  $\text{H}^+$



EXAMPLE XV



0169787

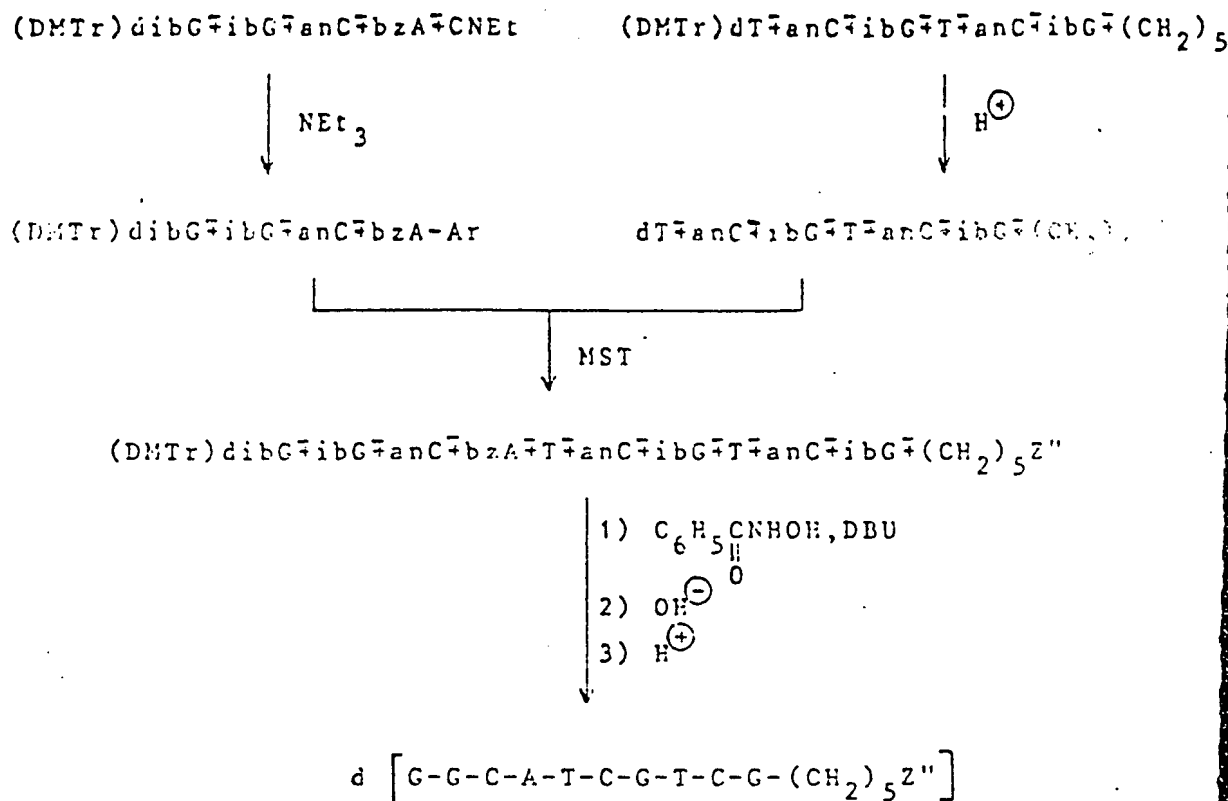
EXCISE

TABLEAU I

Exemple	Système de solvants	Temps de rétention
I	A-C, gradient linéaire de 0 à 30 % en C en 15 mn	9 mn 29 sec
II	A-D, gradient linéaire de 0 à 30 % en D en 15 mn	4 mn
III	A-D, gradient linéaire de 0 à 30 % en D en 15 mn	4 mn
IV	A-D, gradient linéaire de 0 à 30 % en D en 15 mn	4 mn
VII	B-D, gradient linéaire de 0 à 50 % en D en 15 mn	8 mn 26 sec
VIII	B-D, gradient linéaire de 0 à 50 % en D en 15 mn	9 mn 30 sec
IX	B-D, gradient linéaire de 0 à 50 % en D en 20 mn	11 mn 34 sec
X	B-D, gradient linéaire de 0 à 50 % en D en 20 mn	14 mn 54 sec
XI	B-D, gradient linéaire de 0 à 50 % en D en 20 mn	15 mn
XII	B-D, gradient linéaire de 0 à 40 % en D en 15 mn	10 mn
XIII	B-D, gradient linéaire de 0 à 40 % en D en 15 mn	11 mn 17 sec
XIV	B-D, gradient linéaire de 0 à 40 % en D en 15 mn	11 mn 43 sec
XV	B-D, gradient linéaire de 0 à 50 % en D en 15 mn	11 mn 50 sec
XVI	B-D, gradient linéaire de 0 à 50 % en D en 20 mn	17 mn 30 sec

HPLC, colonne polyanion HR 5/5 (Pharmacia), débit 1 ml/mn

A :  $10^{-3}$  M phosphate de potassium (pH = 6)

B :  $10^{-2}$  M phosphate de potassium (pH = 6)

C : 0,2 M phosphate de potassium (pH = 6)

D : 1 M phosphate de potassium (pH = 6)

TABLEAU II

Exemple	Système de solvants	Temps de rétention
I	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 65 % de B <sub>2</sub>	6 mn 38 sec
II	B' <sub>2</sub>	6 mn
III	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 94 % de B <sub>2</sub>	3 mn 24 sec
IV	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 94 % de B <sub>2</sub>	3 mn 30 sec
V	B <sub>2</sub>	10 mn
VI	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 80 % de B <sub>2</sub>	6 mn 50 sec
VII	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 65 % de B <sub>2</sub>	6 mn 41 sec
VIII	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 65 % de B <sub>2</sub>	2 mn 42 sec
IX	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 60 % de B <sub>2</sub>	6 mn 45 sec
X	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 48 % de B <sub>2</sub>	4 mn 35 sec
XI	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 48 % de B <sub>2</sub>	5 mn 36 sec
XII	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 60 % de B <sub>2</sub>	7 mn
XIII	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 48 % de B <sub>2</sub>	4 mn 19 sec
XIV	A <sub>1</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 48 % de B <sub>2</sub>	6 mn
XV	A <sub>2</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 65 % de B <sub>2</sub>	5 mn
XVI	A <sub>2</sub> -B <sub>2</sub> , isocratique avec 50 % de B <sub>2</sub>	5 mn

Colonne : colonne Lichrosorb RP-18 (Merck) ; débit : 1,2 ml/mn

I : CH<sub>3</sub>CN / AAC, eau (18:88:794, v/v)

II : CH<sub>3</sub>CN / AAC, eau (90:88:722, v/v)

III : CH<sub>3</sub>CN / AAC, eau (216:79:605, v/v)

IV : CH<sub>3</sub>CN / AAC, eau (216:79:605, v/v)

V : l'état d'ionisation à pH = 5,9

VI : l'état d'ionisation à pH = 5,9

EXEMPLE XVIIAction des composés I sur l'expression  
du gène 32 du phage T4

Le tableau III donne la séquence du gène 32 du  
phage T4 au voisinage du site d'initiation de la traduction  
de l'ARN messager. Le brin supérieur (codant) correspond  
à la séquence de cet ARN messager (en remplaçant T par U).  
La traduction de l'ARN messager est régulée par le produit  
du gène 32 (protéine 32 ou gp 32). Les oligonucléotides  
de formule générale I qui ont été synthétisés et décrits  
dans le brevet français n° 83 01223 sont représentés dans  
la partie inférieure. Ils sont complémentaires de séquences  
répétées situées en amont de la séquence "Shine et Dalgarno"  
responsable de la fixation des ribosomes. Les trois composés  
I synthétisés comportent 5, 10 ou 15 nucléotides ; ils sont  
liés par leur groupement 3'-phosphate au groupe méthoxy-2-  
chloro-6-( $\omega$ -pentylamino)-9-acridine, schématisée par  
(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr.

L'effet de ces oligonucléotides sur la synthèse  
de la protéine gp 32 a été étudié dans un système de  
transcription-traduction in vitro préparé à partir de la  
souche D10 d'E. coli, appelé S-30. Ce système comporte  
les macromolécules et les organites nécessaires à la  
transcription et à la traduction d'un ADN exogène comportant  
les sites de régulation pour ces processus. L'ADN utilisé  
est le plasmide pKH13 décrit par H.M. KRISCH et B. ALLET  
(1982) Proc. Nat. Acad. Sci. 79, p. 4937-4941. Ce plasmide  
construit à partir de pBR322 comporte une insertion de  
2 000 nucléotides provenant du génome de T4, dont le gène  
32 portant une mutation ambre en position 116 de la chaîne  
protéique. Celui-ci dirige la synthèse d'une protéine

p<sup>9</sup>  
raccourcie (gp'32) par rapport à la protéine 32 normale.  
Cette protéine raccourcie ne régule pas sa propre synthèse  
contrairement à la protéine 32 complète. Dans le système  
S-30, la synthèse de protéines commandée par pKH13 est  
5 effectuée en présence de méthionine <sup>35</sup>S ; l'analyse est  
faite sur gel de polyacrylamide à 15 %, révélé par auto-  
radiographie. On constate que l'oligonucléotide  
de même séquence ne portant pas l'agent d'intercalation  
n'a pas d'effet sur la synthèse de gp'32. Un 8-mère  
10 (T-) <sub>8</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> Acr) dont la séquence n'est pas complémentaire  
d'une séquence du gène 32 n'a aucun effet sur la synthèse  
de gp'32. Le 15-mère couplé à l'acridine inhibe également  
la synthèse de la protéine gp'32. Le même oligonucléotide  
sans intercalant n'a pas d'activité. Les résultats obtenus  
15 démontrent qu'il est possible d'inhiber l'expression d'un  
gène défini par blocage de sa traduction à l'aide d'oligo-  
nucléotides liés à un agent d'intercalation lorsque la  
séquence de l'oligonucléotide est complémentaire d'une  
séquence portée par l'ARN messenger.

GENE 32 - PIAGE T4

$$\left. \begin{array}{l} [\text{Acr}] (\text{CH}_2)_5 \text{ A A T T T}_5 \\ [\text{Acr}] (\text{CH}_2)_5 \text{ A A T T T A A T T T}_5 \\ [\text{Acr}] (\text{CH}_2)_5 \text{ A A T T T A A T T T}_5 \end{array} \right\}$$

EXEMPLE XVIII

Action des composés VI, VII, VIII sur la transcription du gène de la  $\beta$ -lactamase

Le tableau IV donne la séquence du gène bla de la  $\beta$ -lactamase porté par le plasmide pBR322 et le transposon Tn3 et qui est responsable de la résistance des bactéries aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames (pénicilline, ampicilline ...). Le gène bla porté par le plasmide pBR322 provient originellement d'une bactérie du type Salmonella paratyphi B.

Le tableau IV indique le site d'initiation de la transcription du gène bla (position + 1 sur la séquence). En dessous se trouve indiquée la région supposée ouverte par la RNA polymérase lorsqu'elle se fixe sur le promoteur du gène bla. Dans la partie inférieure du tableau IV sont rappelés les trois oligonucléotides liés à l'agent d'intercalation Z" (ici représenté par  $(CH_2)_5Acr$ )

La transcription du gène bla par la RNA polymérase d'E. coli (produit Boehringer) a été suivie à la fois sur le plasmide pBR322 et sur un fragment de 750 paires de bases contenant le promoteur et une partie importante du gène bla. Ce fragment a été obtenu par action des enzymes de restriction PstI et EcoRI. En utilisant trois nucléotides triphosphates (ATP, GTP et UTP) en excès (100 fois) par rapport à l'UTP marqué par un  $^{32}P$  en position  $\alpha$ , on obtient des transcrits de courte longueur marqués radioactivement. Ces transcrits sont séparés sur une gel de polyacrylamide en présence d'urée 7 M et révélés par autoradiographie. Pour assurer une initiation spécifique de la transcription, un dinucléoside monophosphate peut être ajouté au système de transcription.

EXEMPLE XVIII

Action des composés VI, VII, VIII sur la transcription du gène de la  $\beta$ -lactamase

Le tableau IV donne la séquence du gène bla de la  $\beta$ -lactamase porté par le plasmide pBR322 et le transposon Tn3 et qui est responsable de la résistance des bactéries aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames (pénicilline, ampicilline ...). Le gène bla porté par le plasmide pBR322 provient originellement d'une bactérie du type Salmonella paratyphi B.

Le tableau IV indique le site d'initiation de la transcription du gène bla (position + 1 sur la séquence). En dessous se trouve indiquée la région supposée ouverte par la RNA polymérase lorsqu'elle se fixe sur le promoteur du gène bla. Dans la partie inférieure du tableau IV sont rappelés les trois oligonucléotides liés à l'agent d'intercalation Z" (ici représenté par  $(CH_2)_5Acr$ )

La transcription du gène bla par la RNA polymérase d'E. coli (produit Boehringer) a été suivie à la fois sur le plasmide pBR322 et sur un fragment de 750 paires de bases contenant le promoteur et une partie importante du gène bla. Ce fragment a été obtenu par action des enzymes de restriction PstI et EcoRI. En utilisant trois nucléotides triphosphates (ATP, GTP et CTP) en excès (100 fois) par rapport à l'UTP marqué par un  $^{32}P$  en position  $\alpha$ , on obtient des transcrits de courte longueur marqués radioactivement. Ces transcrits sont séparés sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 7 M et révélés par autoradiographie. Pour assurer une initiation spécifique de la transcription, un dinucléoside monophosphate (ppGp) peut être ajouté au système de transcription.



L'étude de l'effet des composés des exemples VII et VIII sur la transcription du gène bla a permis de constater que ces deux composés bloquent la transcription du gène à 37°C. L'effet est spécifique : en effectuant l'étude sur le plasmide pBR322 qui porte plusieurs gènes, seulement une partie des transcrits est affectée par les composés des exemples VII et VIII, ceux qui sont initiés au niveau du promoteur du gène bla. L'effet observé requiert la présence de l'agent d'intercalation : un oligonucléotide de même séquence que VII et VIII n'a pas d'effet sur l'initiation de la transcription du gène bla. Une longueur minimum de l'oligonucléotide est nécessaire : le composé VI (trois nucléotides) n'a aucun effet.

Ces expériences démontrent qu'il est possible de bloquer sélectivement l'expression d'un gène de résistance à un antibiotique en inhibant l'initiation de la transcription de ce gène. La spécificité est obtenue par synthèse d'une séquence d'oligonucléotide complémentaire du brin non codant de l'ADN du voisinage du site d'initiation de la transcription (en amont).



GENE bla (Im3) - REGION D'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION

bla mRNA

+1

-10 region

TGAGACCAATTAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATAATTGAAGAAGGAGGATATG  
ACTCTGTTATTGGGACTATTTACGAAGTTATTATAACTTTTTCCTTCTCA6AC100

Met 307

REGION OUVERTE PAR LA RNA POLYMERASE

-10

-1 +1

5'---AGA---CAATAACCCCTGATAAA---3'  
3'---TCT---GTTATTGGGACTA---5'

TGAC(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Ac  
CCCTGAC(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Ac  
AACCCCTGAC(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Ac

OLIGONUCLEOTIDES SYNTHETIQUES

TAB. IV

0169787

EXEMPLE XIXActivités inhibitrices de la multiplication  
du virus SV40

Le virus SV40 est caractérisé par un génome  
d'ADN circulaire à double brin. La réplication de l'ADN  
démontre dans un site déterminé du génome, appelé  
"origine de réplication", constitué d'environ une centaine  
de nucléotides. Une séquence de 17 paires de bases A.T.,  
et plus particulièrement un double brin polydA.polydT,  
se trouvent à l'intérieur de l'origine de réplication.  
L'existence de cette séquence polydA.polydT permet  
d'envisager le blocage de l'initiation de la réplication  
virale par le biais d'un oligothymidilate couplé à une  
molécule intercalante.

L'effet de différents composés a été examiné  
vis-à-vis de la multiplication du virus SV40 en cultures  
de cellules rénales de singe (cellules CV1) :  
HO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr, T-T-T-T-Et, T-T-T-T-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr,  
T-T-T-T-T-T-T-T-Et et T-T-T-T-T-T-T-T-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Acr,  
(les composés (T-)<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr et (T-)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Acr sont  
obtenus selon le brevet français n° 83 01223).

Des monocouches de cellules CV1 obtenues après  
culture à 37°C, 10 % CO<sub>2</sub>, en boîtes de Pétri de 9 cm<sup>2</sup>,  
sont vidées de leur milieu de culture (milieu Eagle  
modifié par Dulbecco contenant 7 % de sérum de veau fœtal,  
2 mM glutamine, 0,22 % de bicarbonate sodique, 40 µg/ml  
de pénicilline et 40 µg/ml de streptomycine) et inoculées  
avec 0,2 ml d'une suspension de SV40. La dilution de  
virus dans un tampon phosphate isotonique a été choisie  
de façon telle à obtenir dans les cultures témoins environ  
75 % de destruction cellulaire (75 % d'effet cytopathogène)  
après 3 jours d'incubation. Après 1 heure de contact à 37°C,

p<sup>®</sup>  
INSTITUT  
de chimie

5 l'inoculum est retiré et 2 ml du même milieu contenant  
ou non les produits à étudier sont ajoutés. Après 3 jours  
d'incubation à 37°C, sous une atmosphère à 10 % de CO<sub>2</sub>,  
les couches cellulaires sont examinées à l'aide d'un  
microscope inversé (25 x 10). Des cultures de cellules  
non infectées par le virus et traitées avec les produits  
ont été aussi examinées pour déceler des effets cytotoxiques  
éventuels. Les pourcentages de destruction cellulaire dans  
les cultures infectées (effet cytopathogène) et dans les  
10 cultures non infectées (effet cytotoxique des produits)  
sont indiqués dans le tableau V.

PRODUIT		CONCENTRATION en µg/ml	Pourcentage de destruction cellulaire	
			Cultures infectées par SV40 (effet cytopathogène)	Cultures non infectées (effet toxique)
O cultures témoins O			75	0
Acf(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> OH		0.25	75	0
		0.5	50	0
		1.0	75	20 (Toxique)
		2.0	100	100 (Toxique)
(T-) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> Acr		20	44	0
		40	33	0
		80	21	0
(T-) <sub>4</sub> Et		20	75	0
		40	70	0
		80	64	20
(T-) <sub>8</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> Acr		20	50	0
		40	0	0
		80	0	0
(T-) <sub>8</sub> Et		20	50	0
		40	50	0
		80	50	0 (Toxique)

Des faibles inhibitions de la multiplication virale (jugée par l'effet cytopathogène) sont obtenues avec les oligothymidilates non couplés à de l'acridine. Les produits (T-)<sub>4</sub>Et et (T-)<sub>8</sub>et donnent respectivement 64 % et 50 % d'effet cytopathogène par rapport à 75 % dans les cultures non traitées. En revanche, les deux oligothymidilates comportant le groupe acridine (T-)<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr et (T-)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Acr à la concentration de 40 µg/ml diminuent, (T-)<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr, ou empêchent complètement, (T-)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Acr, l'effet cytopathogène. A 80 µg/ml cet effet inhibiteur est maintenu ou accru sans qu'on puisse constater, dans les cultures non infectées, les effets cytotoxiques observés dans le cas des oligonucléotides non couplés à l'acridine. L'intercalant Acr(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>OH n'exerce pas d'effet inhibiteur significatif sur la multiplication virale à 0,25 et à 0,5 µg/ml. A 1 et à 2 µg/ml, ce produit se révèle toxique pour des cellules non infectées. En vue d'apprécier la sélectivité de son action anti-SV40, le produit (T-)<sub>4</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>Acr a été examiné aussi vis-à-vis de la multiplication du virus grippal A/Victoria (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) (en cultures de cellules rénales MDCK) et des virus de l'herpès type 1 et du rhinovirus 1B (en cultures de cellules embryonnaires MRC<sub>5</sub>). Aucune inhibition de l'effet cytopathogène n'a été constatée. Le produit (T-)<sub>8</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>Acr a été examiné également pour son effet inhibiteur éventuel de la multiplication du virus grippal et dans ce même test il a été trouvé inactif. Ces résultats indiquent que des oligothymidilates couplés à une acridine exercent des activités inhibitrices sélectives vis-à-vis de la réplication d'un virus (SV40) contenant dans son origine de réplication des séquences complémentaires correspondantes.

EXEMPLE XXActivités inhibitrices de la multiplication  
de virus grippaux

Le génome des virus grippaux consiste en ARNs en simple brin, segmenté en 8 fragments. Sauf dans le cas de l'ARN qui code pour la neuraminidase (bis cistronique), les autres ARNs codent chacun pour un seul gène viral. La structure primaire de ces ARNs en position 3' est bien conservée parmi chacun de ces fragments et parmi les différents variants antigènes de virus grippal du même type (A, B, C) qui ont été examinés. Cette séquence est :  
 $UCG(\overset{U}{C})UUUCGUCC$  pour les 12 premiers nucléotides. De ce fait, découle la possibilité d'interférer avec la réplication de plusieurs souches de virus grippal par le biais d'oligo-nucléotides complémentaires de cette séquence et couplés à un intercalant (acridine).

L'effet des composés des exemples IX, X et XI a été étudié vis-à-vis de la multiplication des deux virus grippaux A/Victoria et A/Philippines (tous les deux  $H_3N_2$ ) en cultures de cellules MDCK. Des plaques (24 puits,  $2\text{ cm}^2$ ) contenant des monocouches cellulaires ont été vidées de leur milieu de culture (milieu MEM avec sels de Earle, contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 0,22 % de bicarbonate sodique, 40  $\mu\text{g/ml}$  de pénicilline et 40  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine) et inoculées avec 0,1 ml du produit à tester, 0,1 ml d'une suspension virale (à une dilution choisie de façon telle à obtenir après 3 jours de culture une destruction cellulaire -effet cytopathogène- complète) et 0,8 ml de milieu MEM (sels de Earle) contenant 5  $\mu\text{g/ml}$  de trypsine, 0,22 % de bicarbonate sodique, 40  $\mu\text{g/ml}$  de pénicilline et 40  $\mu\text{g/ml}$  de streptomycine.

Des cultures non infectées par le virus ont été utilisées pour rechercher les effets cytotoxiques éventuels de ces produits. Les plaques ont été incubées à 37°C, sous une atmosphère à 10 % CO<sub>2</sub>. Après 3 jours d'incubation, 1 ml de glutaraldéhyde à 5 % est ajouté par puit. 20 minutes après, les puits sont vidés et les couches cellulaires fixées sont colorées avec une solution éthanolique (14 %) de crystal violet à 0,1 % pendant 20 minutes. Après rinçage à l'eau, la destruction des couches est évaluée au microscope et exprimée en pourcentage (0 % : couche intacte ; 100 % : couche entièrement détruite).

Les pourcentages de destruction cellulaire dans les cultures infectées (effet cytopathogène) et dans les cultures non infectées (effet cytotoxique) sont indiqués dans le tableau VI.



TABLEAU VI

Produit	Concentration finale en $\mu\text{g/ml}$	Pourcentage de destruction cellulaire		
		Cultures infectées (effet cytopathogène)	Cultures non infectées (effet cytotoxique)	
		par A/Victoria A/Philippines ( $\text{H}_3\text{N}_2$ ) ( $\text{H}_3\text{N}_2$ )		
$\text{Acr}(\text{CH}_2)_5\text{OH}$	0.25	100	-	0
	0.5	100	-	20 (Toxique)
	1.0	100	-	50 (Toxique)
A-G-C-A-A-A-G-C-A-G-( $\text{CH}_2$ ) <sub>5</sub> Acr XI	75	100	100	0
	150	100	100	0
	300	100	100	20 (Toxique)
A-A-A-G-C-A-G-( $\text{CH}_2$ ) <sub>5</sub> Acr IX	75	100	100	0
	150	50	70	0
	300	5	30	0
A-G-C-G-A-A-A-G-C-A-G-( $\text{CH}_2$ ) <sub>5</sub> Acr X	75	100	100	0
	150	100	100	0
	300	100	75	0

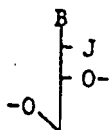
Les résultats obtenus indiquent que le produit 44 exerce des effets inhibiteurs vis-à-vis de la multiplication des deux virus grippaux à des concentrations (150 et 300 µg/ml) qui sont dépourvues de cytotoxicité sur des cultures cellulaires non infectées. Les produits X et XI sont presque totalement inactifs (sauf une faible inhibition sur le virus A/Philippines à 300 µg/ml pour le produit X). Comme cela est indiqué dans le tableau VI, le composé  $\text{Acr}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$  est dépourvu d'activité. Ces résultats indiquent que des oligonucléotides couplés à un intercalant, par exemple le composé IX, peuvent être utilisés comme inhibiteurs de la multiplication de virus grippaux.

#### Pénétration dans les cellules en culture

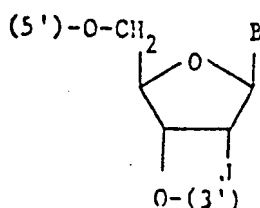
Des cellules en culture ont été incubées en présence des oligonucléotides liés de façon covalente au dérivé intercalant de l'acridine. La pénétration a été suivie en mesurant la fluorescence de l'intercalant de façon qualitative (observation et prise de clichés en microscopie de fluorescence) et de façon quantitative (microspectrofluorimétrie). La fluorescence verte de  $(\text{T})_8(\text{CH}_2)_6\text{Acr}$  est clairement visible dans les cellules de Lewis (tumeur humaine du poumon), dans les cellules EL2 de souris ou dans des cellules CV1 de rein de singe. La pénétration a lieu dans des temps très courts. En 15 minutes, la fluorescence intracellulaire a atteint son maximum. Le spectre de fluorescence enregistré par microspectrofluorimétrie sur une cellule isolée est bien celui attendu pour le dérivé de l'acridine utilisé lié à son oligodésoxynucléotide.

ABREVIATIONS

Dans la description, on utilise la représentation condensée des nucléotides suivante :



qui correspond à la formule développée :



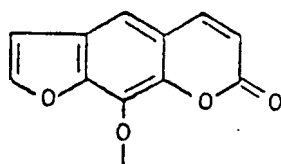
sur laquelle ont été mentionnées les extrémités (3') et (5').

Dans la présente description, les abréviations ci-après sont utilisées

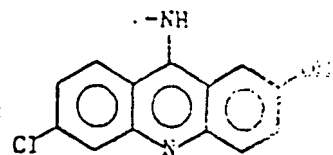
A	2'-déoxyadénosine
C	2'-déoxycytidine
G	2'-déoxyguanosine
bzA	N-benzoyl-2'-déoxyadénosine
anC	N-anisoyl-2'-déoxycytidine
ibG	N-isobutyryl-2'-déoxyguanosine
ODN	oligodésoxyribonucléotide
Ar	parachlorophényle
CNEt	$\beta$ -cyanoéthyle
Me	méthyle

Et        éthyle  
 DMTr     diméthoxytrityle  
 MST     mésitylènesulfonyltétrazolide  
 DMT     diméthyl-1,5-tétrazole  
 T        thymidine

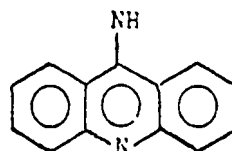
Z' :



Z'' :



Z''' :



TEA        triéthylamine  
 CCM       chromatographie sur couche mince

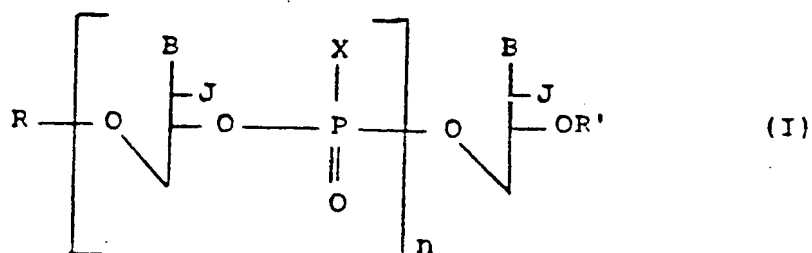
Dans les formules (DMTr)dbzA + anC + ibG + T - Ar, la liaison phosphodiester est représentée par un trait et la liaison phosphotriester est représentée par le symbole (+), chaque phosphate est protégé par le groupe p-chlorophényle (Ar).

# REVENDICATIONS

1) Application de composés oligonucléotides liés à un agent intercalant pour le blocage sélectif d'une séquence d'acide nucléique, dans laquelle ces composés sont constitués par un oligonucléotide ou un oligoûsoxy-nucléotide constitué d'un enchaînement de nucléotides naturel ou modifié complémentaire de la séquence d'acide nucléique à bloquer sélectivement, sur lequel se trouve fixé par une liaison covalente un groupe d'intercalation.

2) Application selon la revendication 1, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique constitue tout ou partie d'une séquence impliquée dans l'initiation, la propagation ou la terminaison de la répliation d'un acide nucléique, de la transcription d'un ou plusieurs gènes et/ou de leur traduction.

3) Application selon l'une des revendications 1 et 2, dans laquelle les composés ont la formule :



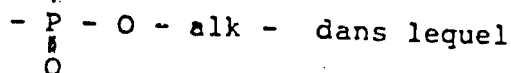
dans laquelle :

les radicaux B peuvent être identiques ou différents et représentent chacun une base d'un acide nucléique naturelle ou modifiée ;

les radicaux X, qui peuvent être identiques ou différents, représentent chacun un oxoanion  $O^{\ominus}$ , un thioanion  $S^{\ominus}$ , un groupe alkyle, un groupe alcoxy, aryloxy, alcoxy ou alkyle substitué par un hétérocycle azoté, un groupe aminoalkyle, un groupe aminoalcoxy, un groupe thioalkyle ou un groupement  $-Y-Z$  ;

B et A', qui peuvent être identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement -Y-Z dans lequel :

Y représente un radical alcoylène droit ou ramifié -alk- ou un radical E



E peut avoir les mêmes significations que X ; ou bien un radical -Y"-O-Y' où Y" et Y' peuvent avoir les significations données pour Y ; et

Z est un radical correspondant à un agent d'intercalation ;

J représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxy ;

n est un nombre entier y compris 0.

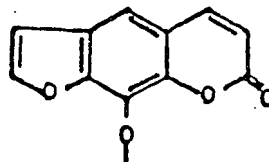
4) Application selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'agent d'intercalation Z est choisi parmi les composés polycycliques ayant une configuration plane.

5) Application selon la revendication 4, caractérisée en ce que Z est choisi parmi l'acridine, la furocoumarine ou l'ellipticine.

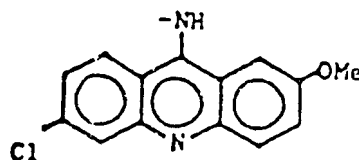
6) Application selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le radical B est un radical correspondant à la thymine, l'adénine, la 2-aminoadénine et ses dérivés substitués, par exemple sur le N<sup>6</sup>, par un groupe aminoalkylène ou par un groupe azidophénylalkylène, la cytosine, la guanine ou la guanine substituée sur le O<sup>6</sup>, par exemple par un groupe (ω-alkylène)-9-acridine, la 8-(ω-aminoalkyl)-aminoadénine et ses dérivés substitués sur le NH<sub>2</sub> en ω par un groupe acridine ; l'uracile, la 5-bromo-uracile, le 8-azidoadénine ou un dérivé photo-activable des bases.

7) Application selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le radical Z est choisi parmi:

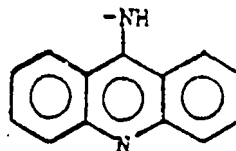
Z'



Z''

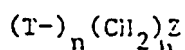


Z'''

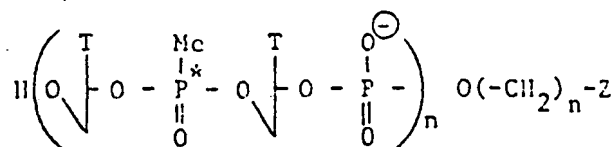


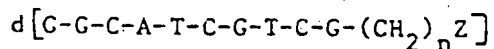
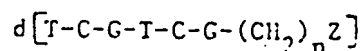
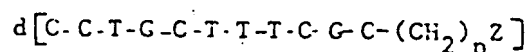
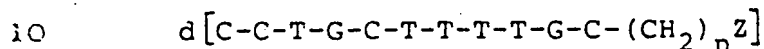
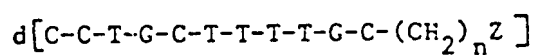
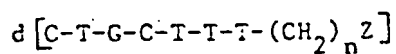
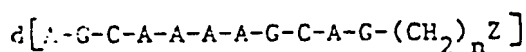
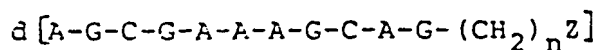
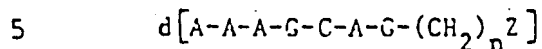
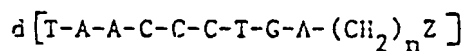
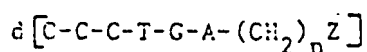
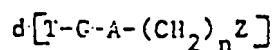
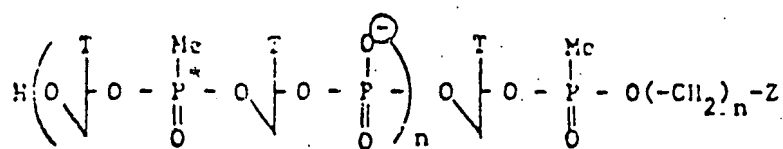
8) Application selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que B est choisi parmi, T, G, A, C et U ; X est choisi parmi O<sup>⊖</sup>, méthyle, éthyle, propyle, méthoxy, éthoxy, propoxy et J = H.

9) Application selon la revendication 1, caractérisée en ce que les composés sont choisis parmi :



10





dans lesquels Z est un agent intercalant.



10) Application selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'on bloque la réplication ou le développement d'un virus, d'une bactérie ou d'un parasite.

11) Application selon la revendication 10, caractérisée en ce que la séquence d'oligonucléotides ou d'oligodésonucléotides est complémentaire d'une région de régulation, d'initiation ou de propagation de la réplication.

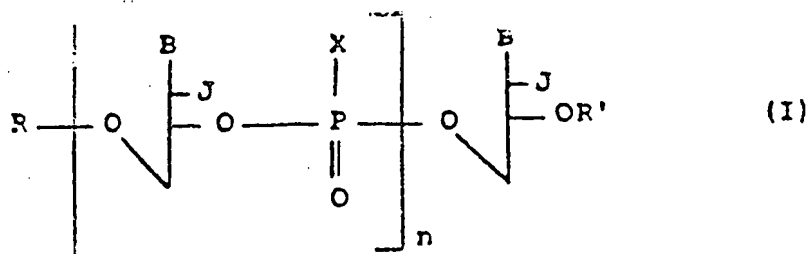
12) Application selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'on bloque l'expression d'un gène codant pour un facteur de résistance aux antibiotiques, aux antiviraux ou aux antiparasitaires.

13) Application selon l'une des revendications 10 et 11, caractérisée en ce que le virus est le virus de la grippe ou le virus de l'herpès.

14) Application selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la séquence d'oligonucléotides ou d'oligodésoxynucléotides est complémentaire d'une partie essentielle assurant l'expression d'un gène oncogène.

15) A titre de médicament un composé constitué par un oligonucléotide ou un oligodésoxynucléotide constitué d'un enchaînement de nucléotides naturel ou modifié complémentaire d'une séquence d'acide nucléique à bloquer sélectivement, sur lequel se trouve fixé par une liaison covalente un groupe d'intercalation.

16) A titre de médicament selon la revendication 15, un composé de formule :



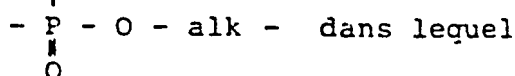
dans laquelle :

les radicaux B peuvent être identiques ou différents et représentent chacun une base d'un acide  
5 nucléique naturelle ou modifiée ;

les radicaux X, qui peuvent être identiques ou différents, représentent chacun un oxoanion  $O^{\ominus}$ , un thioanion  $S^{\ominus}$ , un groupe alkyle, un groupe alcoxy, aryloxy, alcoxy ou alkyle substitué par un hétérocycle azoté, un groupe aminoalkyle, un groupe aminoalcoxy, un groupe thioalkyle ou un groupement  $-Y-Z$  ;

R et R', qui peuvent être identiques ou différents, représentent chacun un atome d'hydrogène ou un groupement -Y-Z dans lequel :

15 Y représente un radical alcoylène droit ou ramifié -alk- ou un radical E



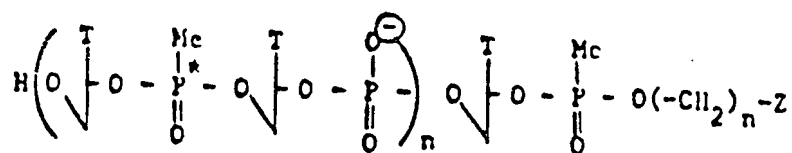
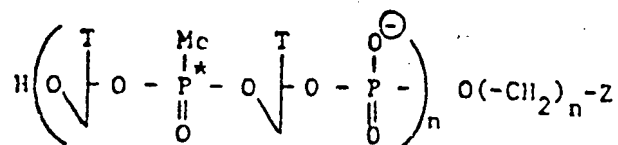
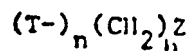
E peut avoir les mêmes significations que X : ou bien un radical  $-Y''-O-Y'$  où  $Y''$  et  $Y'$  peuvent avoir les significations données pour Y ; et

20                    Z est un radical correspondant à un agent  
                      d'intercalation ;

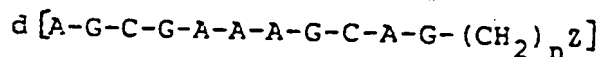
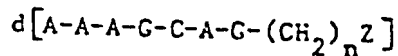
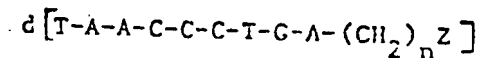
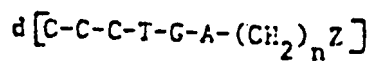
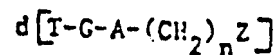
J représente un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxy ;

$n$  est un nombre entier y compris 0.

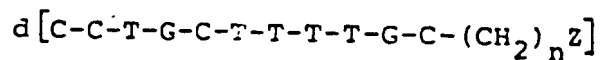
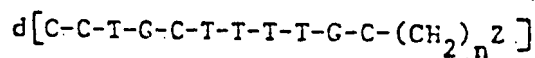
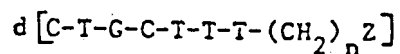
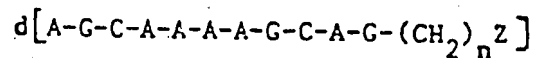
17) A titre de médicament selon la revendication 16, un composé choisi parmi :

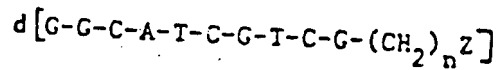
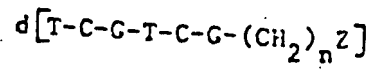
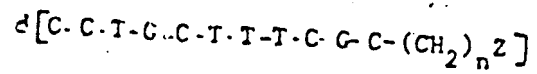


5



10





dans lesquels Z est un agent intercalant.

5

18) Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif au moins un médicament selon l'une des revendications 15 à 17 et un support acceptable en pharmacie.

10

19) Composition pharmaceutique selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle comporte, en outre, un antibiotique, un agent antiparasitaire, un agent antiviral ou un agent antitumoral.



Office européen  
des brevets

# RAPPORT PARTIEL DE RECHERCHE EUROPEENNE

qui selon la règle 45 de la Convention sur le brevet  
européen est considéré, aux fins de la procédure ultérieure,  
comme le rapport de recherche européenne

0169787

Numero de la demande

EP 85 40 1506

## DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 4)
X, Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol.81, no.11, juin 1984, pages 3297-3301; US U.ASSELINE et al.: "Nucleic acid- binding molecules with high affinity and base sequence specificity: Intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides."  * Page 3297 *  ---	1-19	C 07 H 21/00 A 61 K 31/70
Y	BIOCHEMISTRY, vol.17, no.14, 11 juillet 1978, pages 2915-2919; The American Chemical Society, US J.REUBEN et al.: "Structure of mutagen nucleic acid complexes in solution. Proton chemical shifts in 9-aminoacridine complexes with dG-dC, dC-dG, and dA-dT-dG-dA-dT"  * Pages 2915-2916 *  ---	1-19	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 4)  C 07 H 21/00 A 61 K 31/00
./.			

## RECHERCHE INCOMPLETE

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet européen n'est pas  
conforme aux dispositions de la Convention sur le brevet européen au point qu'une recherche  
significative sur l'état de la technique ne peut être effectuée au regard d'une partie des revendica-  
tions

Revendications ayant fait l'objet de recherches complètes: 1-9, 15-19

Revendications ayant fait l'objet de recherches incomplètes:

Revendications n'ayant pas fait l'objet de recherches: 10-14

Raison pour la limitation de la recherche: Méthode de traitement  
chirurgical ou thérapeuti-  
que du corps humain ou  
animal (Voir art. 52(4) de  
la Convention sur le  
brevet européen).

Lieu de la recherche

La Haye

Date d'achèvement de la recherche

02-09-1985

Examineur

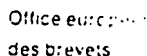
VERHULST

### CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES

- X : particulièrement pertinent à lui seul
- Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  
autre document de la même catégorie
- A : arrière-plan technologique
- O : divulgation non-écrite
- P : document intercalaire

- T : théorie ou principe à la base de l'invention
- E : document de brevet antérieur, mais publié à la  
date de dépôt ou après cette date
- D : cité dans la demande
- L : cité pour d'autres raisons

& : membre de la même famille, document correspondant



**RAPPORT PARTIEL  
DE RECHERCHE EUROPEENNE**

0169787.  
Numéro de la demande

EP 85 40 1506 - 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl 4)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol.101, no.1, 2 juillet 1984, page 3486, réf.no. 3474x, Columbus, Ohio, US U.ASSELINE et al.: "Oligodeoxynucleo- tides covalently linked to interca- lating dyes as base sequence-speci- fic ligands. Influence of dye attachment site." & EMBO J., 1984, 3(4), 795-800.  * Abrégé *	1-19	
P,X	EP-A- 0 117 777 (C.N.R.S.)  * Pages 1-22 *	1-19	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int Cl 4)